



Responses of paddy rice-fed broiler chickens to heat stress

著者	南都 文香
号	52
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1149号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122782

なんと ふみか

氏名（本籍地） 南 都 文 香

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1149 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 28 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）応用生命科学専攻

論 文 題 目 Responses of paddy rice-fed broiler chickens to heat stress（飼料用米給与時
における鶏の暑熱感作応答）

博士論文審査委員 （主査）教 授 豊水 正昭

教 授 麻生 久

教 授 種村 健太郎

博士論文内容要旨

飼料用米給与時における鶏の暑熱感作応答

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

南都 文香

指導教員

豊水 正昭 教授

博士論文構成

第一章 緒論

第二章 飼料用米給与時における鶏の暑熱感作応答特性

第一節 通常飼養環境下における飼料用米給与が肉用鶏の成長におよぼす影響

第二節 急性および慢性暑熱感作に対する飼料用粳米給与鶏のストレス反応特性

第三章 慢性暑熱感作時における粳米給与によるマイナス要因の検討

第一節 粳米飼料中油脂含量の違いの影響

第二節 粳米の粉碎および脱胚処理の影響

第四章 慢性暑熱感作時における粳米飼料給与による成長低下機序の解明とその制御

第一節 慢性暑熱感作時における粳米飼料給与による成長低下機序の解明

第二節 粳米飼料へのトレハロース添加による慢性暑熱ストレス制御

第五章 総合考察

第一章 緒論

我が国の畜産において飼料穀類の海外依存は深刻な問題である。輸入飼料穀物の主体であるトウモロコシはバイオエタノール原料として需要が拡大し、干ばつによる不作などのより、その国際価格は高騰している。将来における畜産物の持続的・安定的供給を実現するためには、海外の穀物需給変動に左右されない“自立的な畜産体系”の確立が重要である。このため、近年、米の飼料化についての研究が積極的に行われている。米は国内自給率が100%を超える穀物で、既存の農地・設備を生かした大規模生産が可能である。表1に示す通り、玄米はトウモロコシにほぼ匹敵する栄養価を含んでいるが、粳米の形状では、トウモロコシと比べ、粗タンパク質や代謝エネルギーが低く、消化率も劣る。しかし、飼料粳米は粳すりや粉碎などの加工を必要しないため、飼料としての原価は低い。本研究では、飼料米、特に飼料粳米の利用促進を目的に、強靱な筋胃を有するがゆえ、他の畜種以上に「全粒粳米」の積極的利用が見込める家禽における至適飼養条件について着目した。

表1 鶏におけるトウモロコシ、玄米および粳米の栄養価(原物当たり)

	粗蛋白質	代謝エネルギー	消化率 (%)		
	(%)	(kcal/g)	粗蛋白質	粗脂肪	可溶無窒素物
トウモロコシ	7.6	3.28	85	94	89
玄米	7.5	3.28	89	83	94
粳米	6.5	2.66	71	50	91

(日本標準飼料成分表, 2009)

すでに、家禽生産における「全粒粳米」の研究の成果の一部は、商業誌に掲載されているが、系統だって報告はほとんどなく、飼料粳米が幅広く応用できる飼料穀物であるか否か、例えば様々なストレス環境下においても利用可能であるかの検討は十分なされていない。

夏季などの暑熱環境は、家禽生産に著しく影響を及ぼす代表的ストレス要因の一つで、地球温暖化問題はこれに関連する最重要課題である。暑熱曝露した家禽生体内反応については数多く調べられている。例えば、酸化ストレス発症 (Azad *et al.*, 2010)、免疫組織の萎縮ならびに機能の抑制 (Niu *et al.*, 2009)、過剰抗体産生 (Heller *et al.*, 1979)、小腸粘膜上皮における形態学的損傷 (Quinteiro-Filho *et al.*, 2010) ならびにバリア機能低下 (Varasteh *et al.*, 2013) などが含まれている。さらに、暑熱時の成長低下には、生体のストレス応答のみならず、腸内環境要因 (腸内細菌叢の変化) も関与する可能性についても報告されている (Sohail *et al.*, 2010)。しかし、これらの報告は、トウモロコシ主体飼料給与時の結果で、飼料粳米を給与した際の成長変化や上述のストレス反応については皆無である。

そこで本研究では、暑熱感作時でも全粒粳米の潜在力を最大に発揮できる飼養技術を開発するため、暑熱環境感作時における全粒粳米の給与が肉用鶏の生産性ならびにストレス応答におよぼす影響を明らかにするとともに、その作用機序の一端を解明した。まず粳米飼料の基本的栄養特性

を明らかにするため、通常環境温度飼養環境（通常環境）下での飼料粃米、玄米、トウモロコシ給与試験を行い（第二章第一節）、次いで粃米飼料給与時における急性および慢性暑熱感作応答を調べた（第二章第二節）。その結果、慢性暑熱感作条件では炎症反応ならびに絨毛陰窩比低下が亢進し、給与方法の改善の必要性が示された。そこで、全粒粃米の至適給与方法を確立するため、慢性暑熱感作時に誘導されたストレス亢進要因を調査した（第三章）。その結果に基づき、最後に、慢性暑熱感作時における粃米飼料給与にともなう成長低下の機序を推定するとともに（第四章第一節）、その栄養制御を試みた（第四章第二節）。

第二章 飼料用粃米給与時における鶏の暑熱感作応答特性

【背景および目的】

本章では、まず粃米飼料の基本的栄養特性を明らかにするため通常環境温度飼養環境（通常環境）下での飼料粃米、玄米、トウモロコシ給与試験を行い（第一節）、次いで粃米飼料給与時における急性（33℃, 12 h）および慢性（33℃, 6 d）の暑熱感作応答特性を明らかにした（第二章第二節）。

第一節 通常飼養環境下における飼料用米給与が肉用鶏の成長におよぼす影響

【背景および目的】

省力化や加工コストを抑える観点から、飼料用米は全粒粃米での利用が望ましいが、全粒粃米を初生から肉用鶏へ給与した試験報告は皆無で、粃米飼料の基本的栄養特性は明らかではない。そこで本節では、通常飼養環境における3つの試験を実施した。まず試験1では、トウモロコシ、全粒粃米、粉碎粃米、玄米の飼料特性をME同一条件で比較した。粃米飼料では対照区と比べ、著しい成長低下が認められた。これには粃米飼料中の高い油脂含量ならびに油脂の種類が考えられた。そのため、試験2では粃米飼料中油脂含量の違い、試験3では粃米飼料中油脂の種類の違いが、肉用鶏雛の成長におよぼす影響をそれぞれ調べた。

【材料および方法】

試験1では、飼料米の形状の異なる4種の試験飼料すなわち、トウモロコシ主体の対照飼料（油脂含量：6%）、飼料中のトウモロコシ全量を形状の異なる全粒粃米、粉碎粃米、ならびに玄米で代替した飼料（油脂含量：10.7, 10.7, 5.6%で、いずれもCP：20%、ME：3.1 kcal/g）を調製した。なお油脂源として大豆油を用いた。粃米はエネルギー含量が低いため、粃米飼料では対照飼料の約2倍量の大豆油を含有させた。試験2では、3種の試験飼料すなわち、トウモロコシ主体の対照飼料（ME：3.1 kcal/g、油脂含量：6%）、トウモロコシ全量を全粒粃米で代替した飼料（ME：

2.8 kcal/g、油脂含量：6%）ならびに玄米で代替した飼料（ME：3.1kcal/g、油脂含量：5.6%）を調製した。油脂源として大豆油を用いた。試験3では、試験2での油脂源を、大豆油の代わりにレンダリング油（飼料用動物性油脂）を用いて同様に調製した。すなわち、トウモロコシ主体の対照飼料（CP：20%、ME：3.1kcal/g、油脂含量：6%）、全粒粳米主体飼料2種：標準ME粳米飼料（ME：3.1kcal/g、油脂含量：11.5%）ならびに低ME粳米飼料（ME：2.8 kcal/g、油脂含量：6%）を調整した。いずれの試験において、0日齢肉用鶏（Ross 308）を供試し、試験飼料をそれぞれ4週間給与した（試験1、2：n=6、試験3：n=8）。連続照明下で飼育し、水ならびに飼料は自由摂取とした。

結果および考察】

試験1において、4週齢時の体重は、対照飼料給与に比べ、全粒および粉碎粳米飼料給与では著しく低下したが、玄米飼料給与では増加傾向にあった（図1.A）。全粒および粉碎粳米飼料給与による成長低下は、飼料中の高い油脂含量（11%：対照飼料の倍量）および油脂の種類（大豆油の使用）により引き起こされたと考えられた。そこで試験2では、粳米飼料中油脂（大豆油）含量の影響の有無について検討した。その結果、玄米給与では試験1同様良好な成長が認められ、低ME粳米飼料給与時の雛の平均体重は、油脂含量が低いにも関わらず、対照飼料給与と同等であった（図1.B）。さらに試験3では、この試験2の結果が、飼料中油脂源が違って再現されるかを、油脂源としてレンダリング油を用いて調べた。その結果、レンダリング油を用いた場合には、全粒粳米主体飼料は、標準MEならびに低MEいずれの条件においても対照飼料給与と遜色ない成長が認められた（図1.C）。以上の結果から、1）玄米は、これまでの報告と一致して肉用鶏トウモロコシ代替物としての有効性が示された。2）粳米は、大豆油10%含有時には成長低下をもたらすが、6%程度含有では油脂の種類によらず正常な成長をもたらし、トウモロコシの代替飼料として有効であることが明らかとなった。

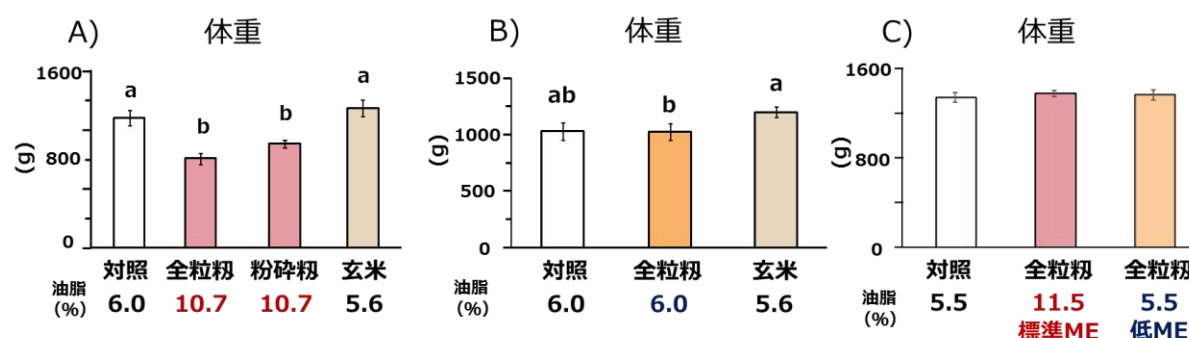


図1. 飼料用米飼料給与が肉用鶏の4週齢時体重におよぼす影響 A) 試験1、B) 試験2、C) 試験3

Values are means \pm SE, n = 4-6 (A, B) or 8 (C), per group.

^{a,b}P < 0.05 for each treatment; values with different letters are statistically different.

第二節 急性および慢性暑熱感作に対する飼料用粳米給与鶏のストレス反応特性

【背景および目的】

前節の結果より、全粒粳米飼料給与は、添加油脂含量を低レベルに抑えている限りトウモロコシ飼料給与と遜色ない成長を示すことが明らかとなった。しかし、暑熱環境下においてもそれがあてはまるか否かは不明である。本節では、粳米給与鶏の暑熱に対するストレス反応を明らかにするため、急性暑熱（試験 1）と慢性暑熱（試験 2）条件下での試験を行った。なお本節では、実用化の観点から、試験飼料の油脂含量は通常環境下では油脂の種類によらず正常な成長が認められている 6%レベルで、油脂源はレンダリング油を用いた。

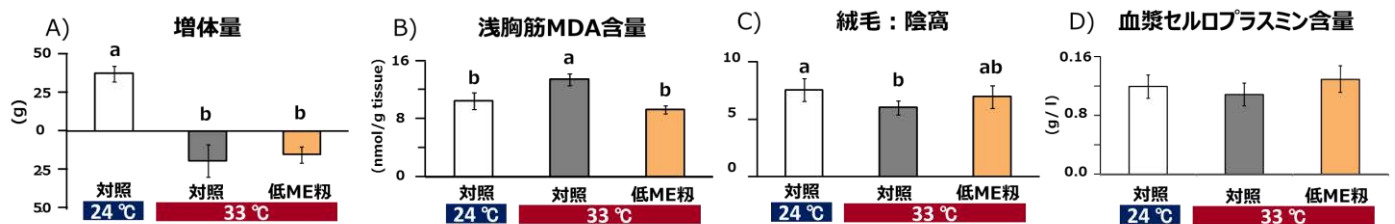
【材料および方法】

0 日齢肉用鶏（Ross 308）を供試し（各区 $n = 8$ ）、トウモロコシ主体の対照飼料（CP : 20%、ME : 3.1 kcal/g、油脂含量 : 6.25%）あるいは粳米を主体とした低 ME 試験飼料（ME : 2.8kcal/g、油脂含量 : 6.25%）を初生から給与した。急性暑熱曝露実験（試験 1）は 21 日齢時に 33℃、12 h、慢性暑熱曝露実験（試験 2）は 22 日齢時から 33℃、6 日間の感作を行い、体重変化、浅胸筋の過酸化脂質（malondialdehyde : MDA）含量、十二指腸形態（絨毛高、陰窩深）血漿セルロプラスミン含量を調べた。

【結果および考察】

急性暑熱感作（試験 1）により、増体量は対照区と粳米区でともに有意に低下し、その低下の程度に両区で差異は認められなかったが（図 2. A）、骨格筋の脂質酸化は、暑熱粳米給与区で暑熱対照区と比べ、抑制され、腸管の絨毛：陰窩比は有意に高い値を示した（図 2. B, C）。急性炎症反応の指標である血漿中セルロプラスミン含量は各区间で差は認められなかった。慢性暑熱感作（試験 2）により、増体量は対照区と粳米区でともに有意に低下し、その低下の程度は、両区で同程度であり（図 2. D）、骨格筋 MDA 含量は各区の間で有意な差は認められなかった（図 2. F）。しかし、腸管の絨毛：陰窩比は粳米飼料給与で低下し、血漿中セルロプラスミン含量は増加傾向を示した（図 2. G, H）。以上の結果から、低 ME 粳米飼料給与は、急性暑熱ストレスを緩和するが、慢性暑熱ストレスを緩和することではなく、ストレス反応は暑熱条件によって異なることが明らかとなった。

急性暑熱感作時



慢性暑熱感作時

図 2. 急性および慢性暑熱感作に対する飼料用籾米給与鶏のストレス応答
 (上段) 急性暑熱感作時における A) 増体量、B) 浅胸筋 MDA 含量、C) 十二指腸の絨毛陰窩比、D) 血漿セルロプラスミン含量
 (下段) 慢性暑熱感作時における E) 増体量、F) 浅胸筋 MDA 含量、G) 十二指腸の絨毛陰窩比、H) 血漿セルロプラスミン含量
 Values are means \pm SE, n = 6-8 per group. a, b, P < 0.05 for each treatment; values with different letters are statistically different.

第三章 慢性暑熱感作時における籾米給与によるマイナス要因の検討

【背景および目的】

前章より、慢性暑熱環境下においては油脂含量を低く抑えた低 ME の籾米飼料であっても、炎症反応の亢進や腸管絨毛：陰窩比の低下が認められ、籾米飼料給与による負の効果が明らかとなった。籾米飼料の利用性を高めるためには、これら負の効果を効率的に制御する必要がある。そこで本章では、慢性暑熱感作時における籾米飼料給与による負の効果が、籾米飼料の何によってもたらされるか、その要因を検討した。第二章第一節の結果から、籾米含有飼料のマイナス要因として、飼料中油脂含量や籾米に含まれる籾が重要であると考えられた。そのため、籾米飼料中油脂含量の違い（第一節）と、籾殻の有無ならびに籾殻の形状の違い（第二節）による慢性暑熱応答の差異について調べ、慢性暑熱感作時に発現する籾米含有飼料のマイナス要因を明らかにした。

第一節 籾米飼料中油脂含量の違いの影響

【背景および目的】

籾米飼料中油脂含量の違いによる鶏の慢性暑熱感作応答の差異を明らかにするため、油脂 11%（標準 ME）ならびに油脂 6%（低 ME）含有籾米飼料の給与試験を行った。

【材料および方法】

0 日齢肉用鶏雄（Ross 308）を供試し、トウモロコシ主体の対照飼料（CP：20%、ME：3.1kcal/g、油脂含量：5.5%）あるいは全粒粳米を主体とした標準 ME 粳米飼料（ME：3.1kcal/g、油脂含量：11%）や低 ME 粳米飼料（ME：2.8kcal/g、油脂含量：5.5%）の計 3 種の飼料を 4 週齢まで給与した。配合飼料の油脂はレンダリングを用いた。暑熱曝露は、対照区の半数ならびに粳米区の全羽を 22 日齢時より 33℃、7 日間慢性暑熱曝露した（各区 n = 8）。暑熱期間における増体量、腸管形態（回腸の絨毛高、陰窩深）、血中内毒素濃度、肝臓 MDA 含量および血漿セルロプラスミン含量を測定した。

【結果および考察】

慢性暑熱感作により、増体量は対照飼料給与区で有意に低下し、その低下は暑熱対照区と低 ME 粳米区で同程度であったが、標準 ME 粳米区では暑熱対照区と比べ有意に低下した（図 3. A）。回腸の絨毛：陰窩比は、暑熱対照区と比べ両粳米給与区でさらに低下した（図 3. B）。血中内毒素濃度（腸管バリア機能の指標）、肝臓の MDA 含量（脂質過酸化の指標）、血中セルロプラスミン含量は、暑熱標準 ME 粳米区で高い値を示した（図 3. C, D, E）。以上の結果から、慢性暑熱環境下では、低 ME 粳米飼料は実験条件によっては対照飼料と同レベルの成長をもたらすが、標準 ME 粳米飼料すなわち高い油脂含量の粳米飼料は成長低下をもたらし、粳米飼料中の高い油脂含量は、慢性暑熱時の生産性に負の効果に関与することが示された。

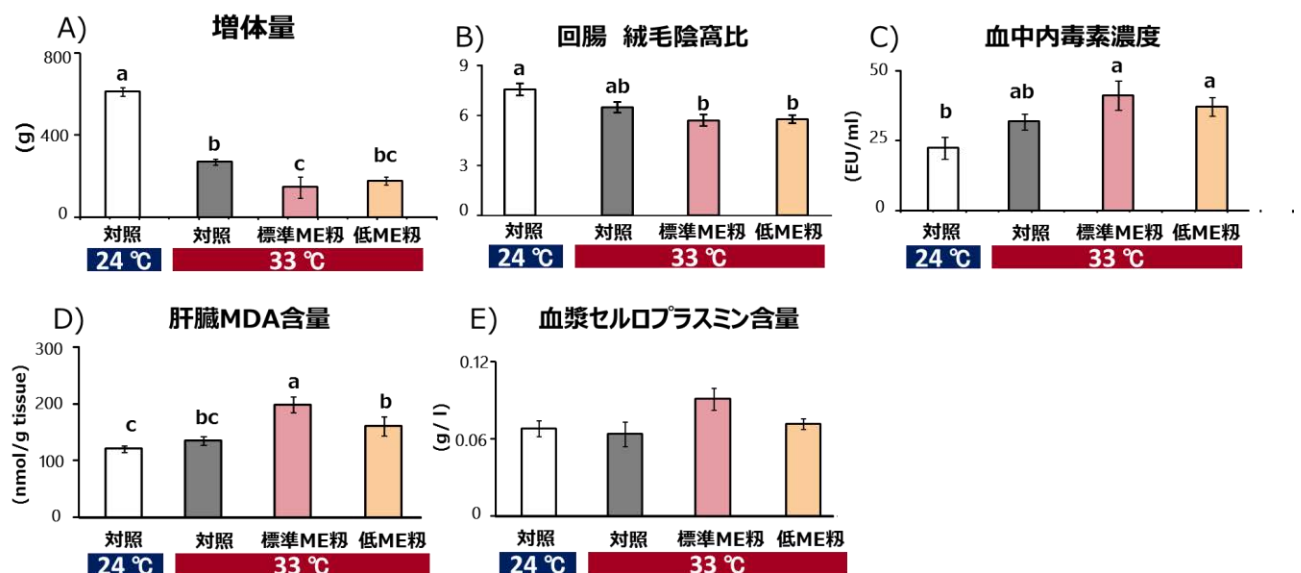


図 3. 油脂含量の異なる粳米飼料給与が鶏の慢性暑熱感作応答へおよぼす影響

A) 増体量、B) 回腸の絨毛陰窩比、C) 血中内毒素濃度、D) 肝臓 MDA 含量、E) セルロプラスミン含量

Values are means \pm SE, n = 8 per group. ^{a,b,c}P < 0.05 for each treatment; values with different letters are statistically different.

第二節 粳米の粉碎および脱俘処理の影響

【背景および目的】

粳穀には、強靱な殻を形成しているケイ酸が多く含まれている。暑熱環境下では鶏の消化管上皮は損傷を受けやすい状態にあり、ここに摂取した粳穀が下部消化管に存在すると物理的に腸管が傷つけられやすい状態にあると考えられた。そこで本節では、粳穀の有無ならびに粳穀の形状の違いによる慢性暑熱応答の差異について調べた。

【材料および方法】

0 日齢肉用鶏雄（Ross 308）を供試し、ME 含量を一定にした 4 種の試験飼料、すなわちトウモロコシ主体の対照飼料（CP：20%、ME：3.1kcal/g、油脂含量：5.5%）、全粒もしくは粉碎粳米主体飼料（ME：3.1kcal/g、油脂含量：11%）、ならびに玄米主体飼料（ME：3.1kcal/g、油脂含量：5%）を 4 週齢まで給与した。なお、配合飼料の油脂はレンダリングを用いた。暑熱感作は第一節に準じた。

【結果および考察】

慢性暑熱下において、増体量は対照飼料給与区で有意に低下し、その低下は玄米区では対照区と同程度であったが、全粒粳米および粉碎粳米区では対照飼料区に比べさらに低下した（図 4. A）。回腸の絨毛：陰窩比ならびに腸管バリア機能低下の指標である血中内毒素濃度は暑熱各区でほとんど違いは認められなかった（図 4. B, C）。肝臓の MDA 含量は、暑熱対照区と比べて、全粒粳米区でわずかに増加し、粉碎粳米区ではさらに増加したが、玄米区では暑熱対照区と同程度であった（図 4. D）。血漿セルロプラスミン含量は各区で違いは認められなかった（図 4. E）。以上の結果から、粳米の粉碎処理は、鶏の慢性暑熱感作応答に影響しないことが示された。以上の結果から、慢性暑熱環境下で、玄米飼料は対照飼料と同レベルの成長を示すが、粳米が全粒であっても粉碎されていても粳米配合飼料は成長低下をもたらす、粳穀は、慢性暑熱時の鶏の成長低下を助長している一因子であることが明らかとなった。

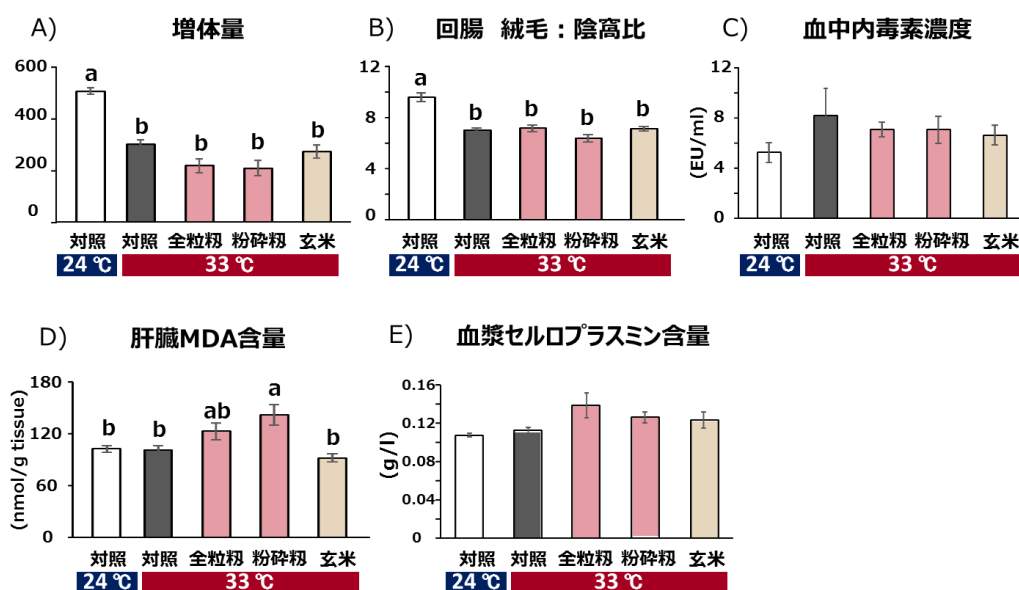


図 4. 籾米の粉碎ならびに脱胚処理が鶏の慢性暑熱感作応答へおよぼす影響

A) 増体量、B) 回腸の絨毛陰窩比、C) 血中内毒素濃度、D) 肝臓 MDA 含量、E) セルロプラスミン含量
Values are means \pm SE, n = 8 per group. ^{a,b,c}P < 0.05 for each treatment; values with different letters are statistically different.

第四章 慢性暑熱感作時における籾米飼料給与による成長低下機序の解明とその制御

【背景および目的】

前章の結果より、慢性暑熱時には籾米飼料に含まれる油脂の含量と籾殻は生産性に負の効果を示すことがわかった。そこで本章第一節では、この負の効果を合理的に制御するため、高油脂含有籾米飼料給与にともなう成長低下の機序の一旦を解明し、第二節ではその栄養制御を試みた。

第一節 慢性暑熱感作時における籾米飼料給与による成長低下機序の解明

【背景および目的】

前章までに、慢性暑熱感作時において標準 ME 籾米飼料（高脂肪籾米飼料）給与すると、著しく成長は低下し、この時に腸管では絨毛陰窩比が低下しており、血中内毒素の濃度の上昇、肝臓の酸化ストレス反応や炎症反応が亢進していることが判明した。しかし、これら生体応答がどのように相互に関連して成長低下にいたるのか、詳細な機序は不明である。そこで本節では、慢性暑熱感作時における籾米飼料給与にともなう成長低下機序を明らかにするため、腸管および肝臓における酸化ストレス、炎症反応をより詳細に調査し、これらの関連性から成長低下機序を推定した。さらに、この成長低下機序と腸内細菌叢変化との関連性についても調べた。

【材料および方法】

通常環境条件下（試験 1）と慢性暑熱条件下（試験 2）で粳米給与試験をそれぞれ実施した。動物実験には 0 日齢肉用鶏雄を供試し、3 種類の試験飼料、すなわちトウモロコシ主体の対照飼料（CP：20%、ME：3.1kcal/g、油脂含量：5.5%）、全粒粳米主体飼料（ME：3.1kcal/g、油脂含量：11%）、ならびに玄米主体飼料（ME：3.1kcal/g、油脂含量：5%）を 4 週間給与した。配合飼料の油脂は YGL（飼料用植物油脂＋豚脂）を用い、暑熱感作条件は前章に準じ、増体量、飼料摂取量を測定した。試験終了後、回腸粘膜上皮における形態変化（絨毛陰窩比）、酸化損傷（過酸化脂質含量、カルボニル化タンパク質含量）、バリア機能（血中内毒素濃度、細胞間接着タンパク質遺伝子発現）ならびに炎症反応（免疫関連遺伝子発現）を、また肝臓における酸化損傷ならびに炎症反応（免疫関連遺伝子発現）を調べ、全身性の炎症反応（血漿セルロプラスミンおよびインターロイキン 6 (IL-6) 含量）も調べた。回腸および盲腸内細菌叢の菌種構成の推定には、高速シーケンサー（Illumina MiSeq2000）を用いた網羅的 16S-rRNA 配列解析を行った。

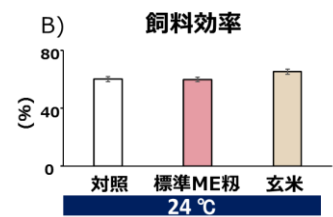
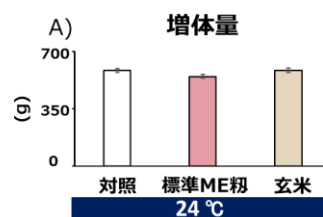
【結果および考察】

通常飼養環境下（試験 1）では、増体量および飼料効率は各試験飼料による差は認められなかった（図 5. A, B）。これに対して、慢性暑熱感作時（試験 2）では、増体量および飼料効率は、暑熱感作により対照飼料区で有意に低下し、その低下は、標準 ME 粳米区では暑熱対照区より有意にさらに低下したが、玄米区では暑熱対照区と同等であった（図 5. C, D）。したがって、暑熱環境下でのみ、標準 ME 粳米飼料給与による成長低下が認められた。

そこで、まず回腸におけるストレス応答を調べた。絨毛：陰窩比は、暑熱対照区と比べ、標準 ME 粳米区では有意に低下し

（図 6. A）、粘膜組織の MDA 含量ならびにカルボニル化タンパク質含量は、暑熱対照区と比べ、標準 ME 粳米区で有意に高く、酸化ストレスが亢進していることが判明した（図 6. B, C）。細胞間接着に働くタイトジャンクションを構成する膜タンパク質である Claudin-1 および 5 の遺伝子発現は、暑熱感作により対照飼料区で増加し、その増加は暑熱対照区と玄米区では同程度であったが、標準 ME 粳米区では暑熱対照区と比べ低かった（図 6. E）。グラム陰性菌の外膜を構成する成分のひとつである血中内毒素の濃度は、暑熱対照区と比べ、標準 ME 粳米区で、有意ではないが高い値を示し（図 6. D）、暑熱感作時において、内毒素濃度は Claudin-1 あるいは Claudin-5 の遺伝子発現との間に負の相関関係が認められた（Claudin-1: $r = -0.36, p < 0.1$, Claudin-5: $r = -0.40, p < 0.05$ ）。

通常環境



慢性暑熱感作時

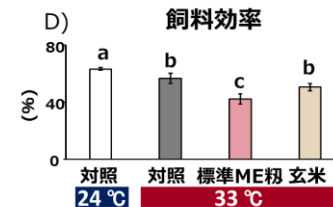
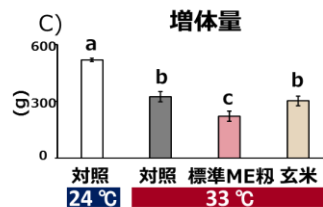
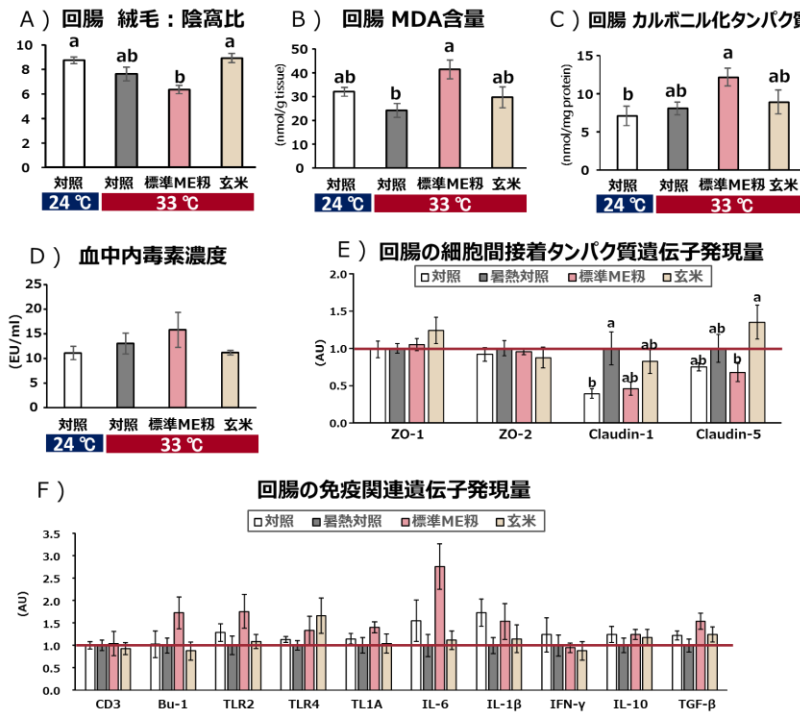


図 5. 通常環境 (A,B) および慢性暑熱感作時 (C,D) における飼料用米給与が増体量ならびに飼料効率におよぼす影響。Values are means \pm SE, $n = 8$ per group. ^{a,b,c} $P < 0.05$ for each treatment; values with different letters are statistically different.

また、免疫関連遺伝子のうち前炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α 様リガンド 1A (TL1A) ならびに IL-6 は暑熱対照区と比べ標準 ME 粳米区で高い値を示し (図 6. F)、IL-6 発現量は血中内毒素濃度との間に正の相関を示した ($r = 0.54$)。したがって、回腸組織では、標準 ME 粳米給与



により、形態的ダメージならびに酸化ストレスが亢進し、その結果バリア機能が低下して内毒素が流入し、これが腸管での炎症反応を亢進させたと考えられた。

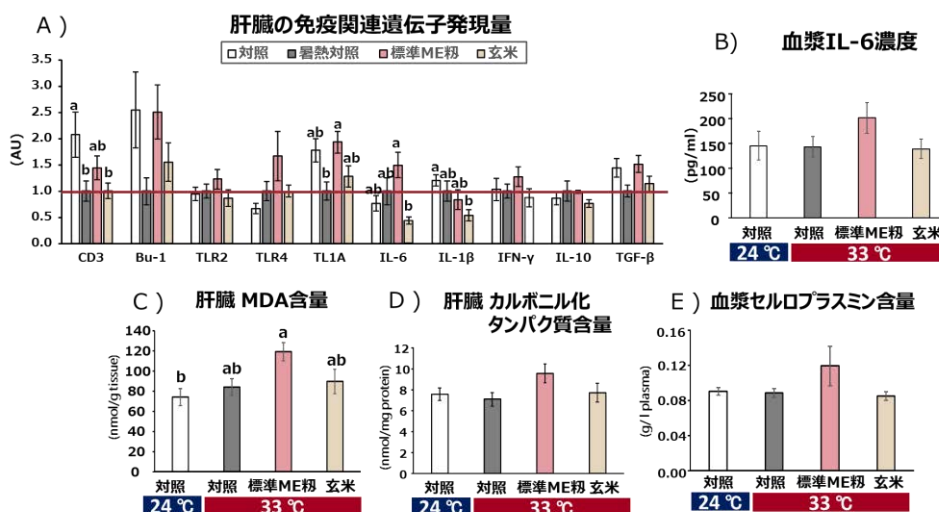
図 6. 慢性暑熱感作時における飼料用米給与が回腸のストレス応答へおよぼす影響

- A) 回腸の絨毛：陰窩比、
- B) 回腸の MDA 含量
- C) 回腸のカルボニル化タンパク質含量、
- D) 血中内毒素濃度、
- E) 回腸の細胞間接着タンパク質遺伝子発現量

F) 回腸の免疫関連遺伝子発現量、
Values are means \pm SE, $n = 8$ per group.

a,b,cP < 0.05 for each treatment; values with different letters are statistically different.

これら血中内毒素や腸管で産生された炎症性サイトカインは、門脈を通過し肝臓でも作用していると考えられた。そこで、肝臓におけるストレス応答を調べた。免疫関連遺伝子のうち T 細胞数の指標である CD3、Toll 様受容体 4 (TLR4) や IL-6 は、暑熱対照区と比べ標準 ME 粳米区で高い値を示した (図 7. A)。また血中 IL-6 濃度は、遺伝子発現と同様に標準 ME 粳米区で高い値を示し (図 7. B)、これは IL-6 発現量と正の相関を示した ($r = 0.37$)。さらに標準 ME 粳米区では、酸化損傷 (MDA 含量ならびにカルボニル化タンパク質含量の増加) や炎症反応 (血漿セルロプラスミン含量の増加) の各亢進も認められ (図 7. B, C, D)、酸化損傷あるいは炎症反応は IL-6 発現と



の間に有意な相関を示した。

図 7. 慢性暑熱感作時における飼料用米給与が肝臓のストレス応答へおよぼす影響

- A) 免疫関連遺伝子発現
 - B) 血漿 IL-6 濃度
 - C) MDA 含量
 - D) カルボニル化タンパク質含量、
 - E) 血漿セルロプラスミン含量、
- Values are means \pm SE, $n = 8$ per group. a,b,cP < 0.05 for each treatment; values with different letters are statistically different.

したがって、肝臓へ内毒素や炎症性サイトカインが流入して IL-6 発現が上昇しており、ここでも酸化損傷ならびに炎症反応が誘導されたと考えられた。

さらに、生体の暑熱感作応答と腸内細菌叢変化との関連についても調べた。UniFrac 解析の結果、盲腸の細菌叢構造は、通常環境下および暑熱環境下いずれにおいても、対照飼料給与区と標準 ME 粳米飼料給与区との間で有意な違いは認められなかった (図 8. A, B)。一方、回腸の細菌叢構造は、通常環境下では、対照飼料給与区と標準 ME 粳米飼料給与区との間で有意に異なるが (図 8. C)、暑熱環境下ではその違いは認められなかった (図 8. D)。

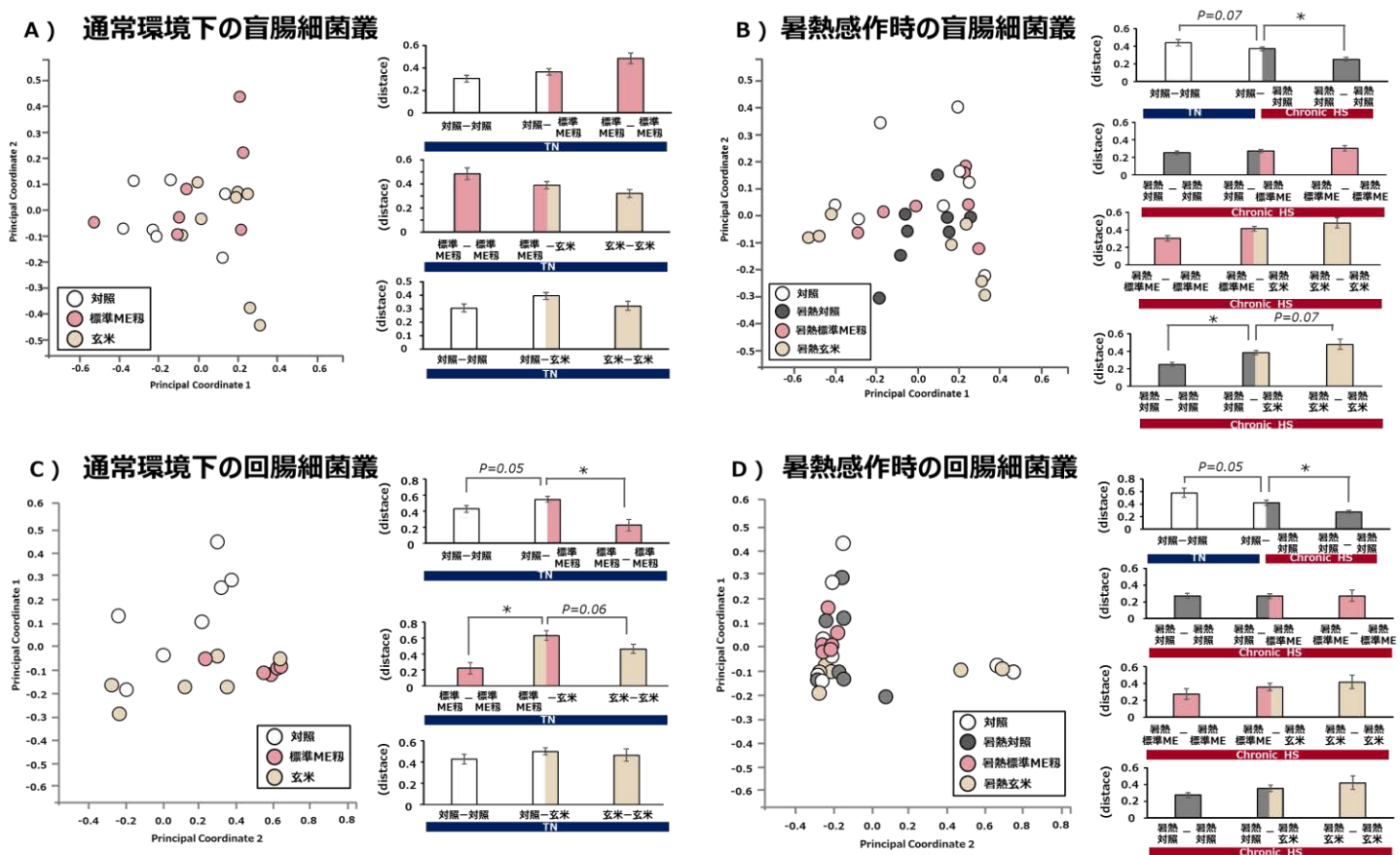


図 8. 飼料用米給与鶏の腸内細菌叢の PCoA プロットおよび UniFrac 距離

A) 通常環境下の盲腸細菌叢、B) 暑熱感作時の盲腸細菌叢、C) 通常環境下の回腸細菌叢、D) 暑熱感作時の回腸細菌叢

Values are means \pm SE, $n = 6-8$ per group. * $P < 0.05$; two-sided Student's t test.

次に、試験飼料による菌叢構造の違いが認められた回腸の細菌叢に着目し、属レベルの菌構成を調べた。通常環境下において、対照および玄米飼料給与では *Lactobacillus* 属が優勢（6–7 割）を占めていたが、標準 ME 粳米飼料給与では *Streptococcus* 属が 6 割以上を占めていた（図 9. A）。暑熱感作により、標準 ME 粳米飼料給与区では、優勢を占めていた *Streptococcus* 属の占有割合が 1 割以下（7%）まで減少し、*Lactobacillus* 属優位な菌叢構造へ変化し、対照区および玄米飼料給与区では、*Lactobacillus* 属の占有割合がさらに増加した（図 9. B）。

Lactobacillus 属の菌種の中で最も優勢を占めた *Lactobacillus crispatus* は、通常環境下では対照区と比べ標準 ME 粳米区で低かったが、暑熱感作時では標準 ME 粳米区で高い割合を示した（図 10. A, B）。*L. crispatus* は、腸管内の主要な過酸化水素産生菌で、免疫賦活効果を有すること知られているが、この効果は菌株レベルで違いがある。Tobita *et al.* (2010)

は、*Lactobacillus crispatus* KT-11 株をマウスへ給与すると、TLR2 および NOD1/2 を介し免疫応答を亢進すると報告している。このことから、標準 ME 粳米飼料給与時における暑熱感作時の *L. crispatus* の増加が、回腸の免疫反応の亢進に関与した可能性が推察されるが、菌株の同定ができないことや解析個体数が少ないことを考えると、この関連についてはさらなる調査が必要である

以上より、慢性暑感作時における標準 ME 粳米飼料（高い油脂含量の粳米飼料）の給与による成長低下は、図 11 に示すように誘導されたと考えられる。1) 腸管粘膜上皮における形態的損傷（絨毛陰窩比低下）ならびに酸化損傷の増加により、バリア機能が低下し、2) 腸内細菌由来の内毒素が流入し、3) 腸管での炎症反応が誘導され、流入した内毒素ならびに炎症反応により産生されたサイトカインは、門脈を介して代謝の中心臓器である肝臓に作用し、肝臓において酸化ストレスならびに炎症反応が亢進し、4) 成長が低下したと考えられた。なお、腸内細菌叢の解析から、暑熱感作時における腸内細菌叢変化が腸管における炎症反応亢進と関連している可能性も示唆されたが、この関連性についてはさらなる調査が必要である。

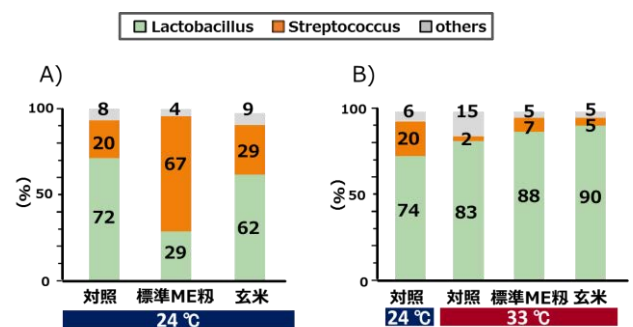


図 9. 回腸内細菌叢の属レベルにおける細菌構成
A) 通常環境下、B) 慢性暑熱感作時

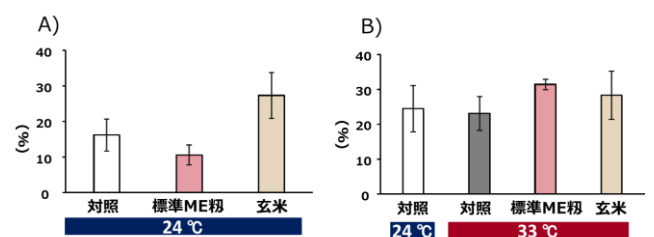


図 10. *Lactobacillus crispatus* の占有率
A)通常環境、B)暑熱感作における占有率
Values are means \pm SE, n = 6-8 per group

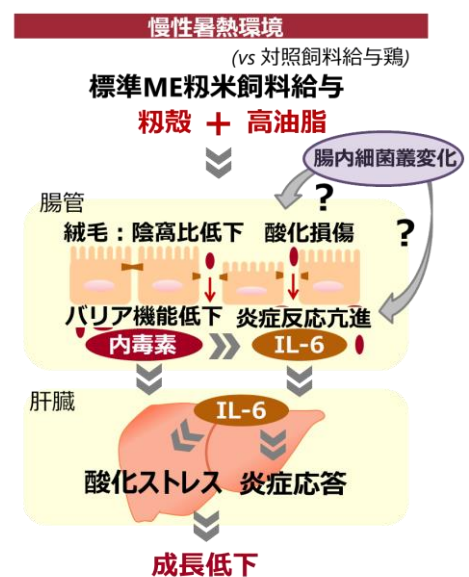


図 11. 慢性暑熱感作時における標準 ME 粳米給与による成長低下機序予想

第二節 粳米飼料へのトレハロース (Tre) 添加による慢性暑熱ストレス制御

【背景および目的】

前節の慢性暑熱感作時における標準 ME 粳米飼料（高油脂含有粳米飼料）給与にともなう成長低下機序の予想図に示すとおり（図 8）、腸管におけるストレス反応の亢進が成長低下の引き金となっている可能性が示された。腸管におけるストレス反応を制御できる機能性資材としてトレハロース (Tre) が考えられた。Tre はグルコースが α, α -1,1 結合した二糖であり（図 12）、これまで、通常飼養環境下における鶏への給与により、回腸の炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制効果が認められている (Kikusato *et al.*, 2016)。さらに、暑熱感作鶏においても、Tre 添加飼料給与は、暑熱感作にともなう脾臓の炎症性サイトカイン発現上昇を抑制することが報告されている (大津ら, 2011)。そこで、本試験では標準 ME 粳米飼料（高油脂含有粳米飼料）への Tre の添加による慢性暑熱感作時の成長低下に対する緩和効果について調べた。

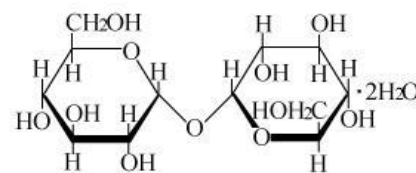


図 12. トレハロース構造式

【材料および方法】

0 日齢肉用鶏雄を供試し、トウモロコシ主体の対照飼料（CP : 20%、ME : 3.1kcal/g、油脂含量 : 5.5%）、全粒粳米主体飼料（ME : 3.1kcal/g、油脂含量 : 11%）、ならびにこの粳米主体飼料に Tre を 0.5 もしくは 1.5% 添加した飼料の計 4 種の飼料を 4 週間給与した。配合飼料の油脂はレンダリングを用いた。暑熱感作は前章に準じた。

【結果および考察】

慢性暑熱下において、増体量は対照飼料区で有意に低下し、標準 ME 粳米区では対照区に比べさらに低下した（図 13. A）。標準 ME 粳米飼料給与によるこの低下は Tre0.5% 添加では有意に改善したが ($p < 0.05$, t-test)、Tre1.5% 添加では有意な改善ではなかった。飼料効率は、増体量と同様に、暑熱粳米区と比べ、Tre 0.5% 添加では有意に改善したが ($p < 0.05$, t-test)、Tre1.5% 添加では改善は有意ではなかった（図 13. C）。

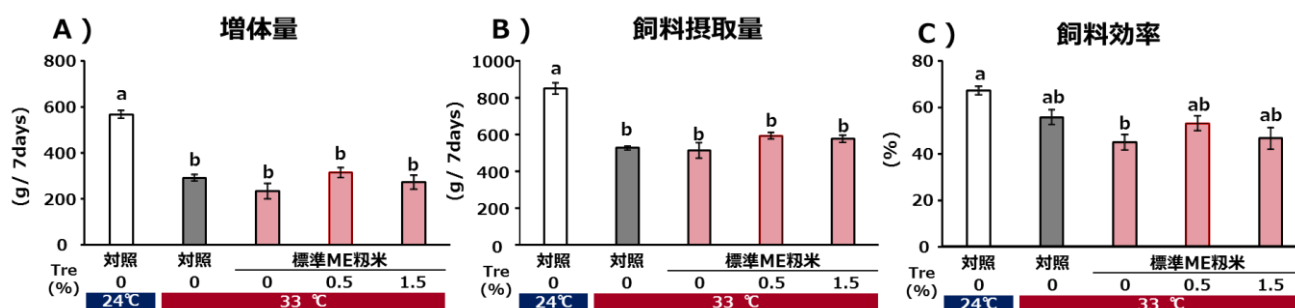


図 13. 飼料用米へトレハロース添加が暑熱感作時の増体量、摂取量ならびに飼料効率におよぼす影響

Values are means \pm SE, n = 8 per group. ^{a,b,c}P < 0.05 for each treatment; values with different letters are statistically different.

そこで成長改善効果が認められた Tre0.5%添加時におけるストレス反応を調べた。その結果、回腸の絨毛：陰窩比は、暑熱対照区と比べ、標準 ME 粳米区でわずかに低下したが、この低下は Tre 添加で改善した（図 14. A, $p < 0.05$, t-test）。血中内毒素濃度は、暑熱対照区ならびに標準 ME 粳米区で上昇したが、これは Tre0.5%添加区で通常環境対照区レベルまで抑制された（図 14. B）。IL-6 遺伝子発現は、暑熱対照区と比べ、標準 ME 粳米区で高い値を示したが、これは Tre 添加で抑制された（図 14. C）。肝臓 MDA 含量ならびに血漿セルロプラスミン含量は、暑熱対照区と比べ、標準 ME 粳米区で増加したが、この増加は Tre0.5%添加で抑制された（図 14. D, E）。したがって、標準 ME 粳米飼料への Tre0.5%添加による暑熱感作時の成長低下の緩和は腸管におけるストレス反応の抑制、次いで肝臓のストレス反応の抑制の結果と考察できる。

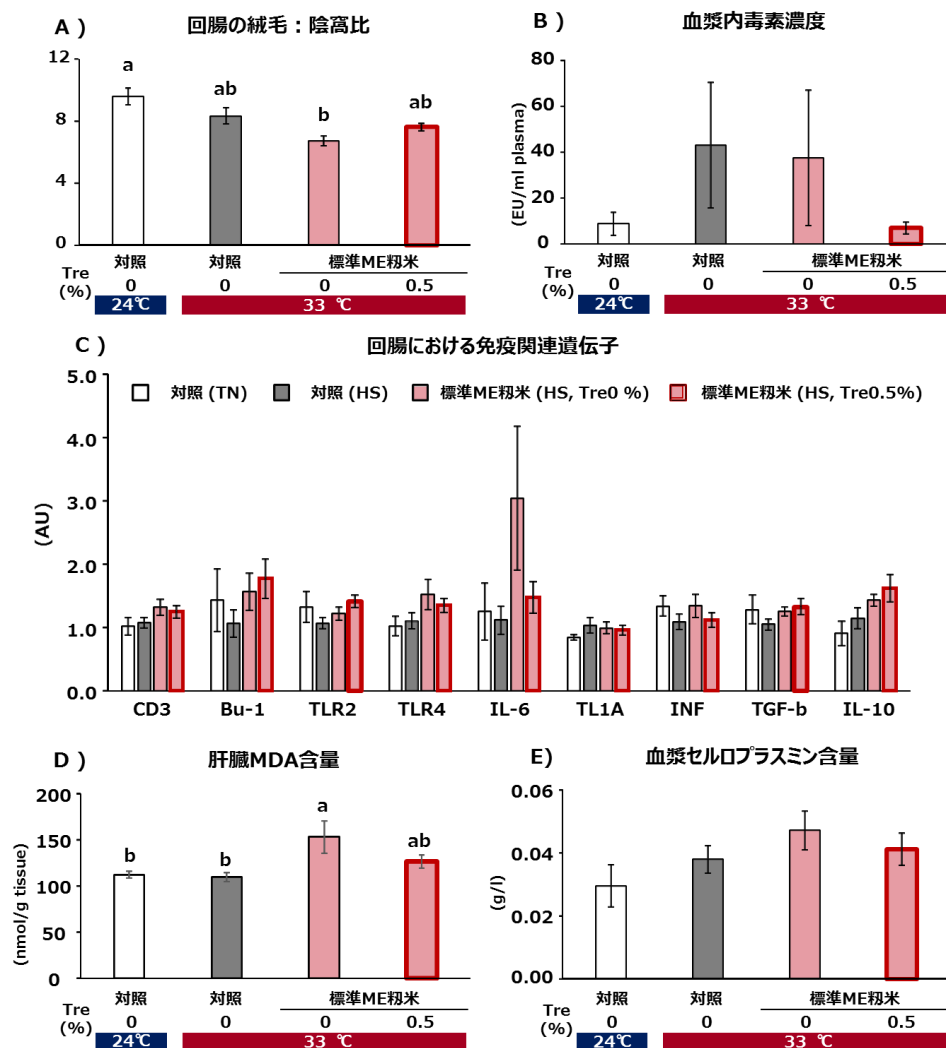


図 14. 飼料用米へトレハロース 0.5%添加が暑熱感作時のストレス反応におよぼす影響
A) 回腸絨毛：陰窩比、B) 血漿エンドトキシン濃度、C) 回腸における免疫関連遺伝子発現
D) 肝臓 MDA 含量、E) 血漿セルロプラスミン含量

Values are means \pm SE, $n = 8$ per group. ^{a,b} $P < 0.05$ for each treatment; values with different letters are statistically different.

第五章 総合考察

最近の世界的な穀物需給のひっ迫状況を鑑みると、現状の我が国の畜産を、自給飼料基盤に立脚した家畜・家禽生産体系へとシフトさせることは喫緊の課題である。これには我が国の水田が持つ機能をフル活用し、トウモロコシを中心とした輸入飼料の代替としての米の利用を拡大させていく必要があると考えられる。本研究では、暑熱感作時でも全粒粳米の潜在力を最大に発揮できる飼養技術を開発するため、暑熱環境感作時における全粒粳米の給与が肉用鶏の生産性ならびにストレス応答におよぼす影響を明らかにするとともに、その作用機序の一端を解明した。まず粳米飼料の基本的栄養特性を明らかにするため、通常環境温度飼養環境（通常環境）下での飼料粳米、玄米、トウモロコシ給与試験を行い（第二章第一節）、次いで粳米飼料給与時における急性および慢性暑熱感作応答を調べた（第二章第二節）。その結果、粳米飼料給与は、急性条件では酸化損傷および腸管絨毛陰窩比低下を緩和するが、慢性暑熱感作条件では炎症反応ならびに絨毛陰窩比低下が亢進し、給与方法の改善の必要性が示された。そこで、全粒粳米の至適給与方法を確立するため、慢性暑熱感作時に誘導されたストレス亢進要因を調査し、これには飼料中の高い油脂含量と粳米（粳殻）が関与していることを示した（第三章）。さらに、慢性暑熱感作時における油脂含量の高い粳米飼料給与による成長低下機序を推定し、腸管におけるストレス反応の亢進が成長低下の引き金の一つであることを明らかにし、この腸管のストレス反応は腸内細菌叢変化と関連している可能性も示唆した（第四章第一節）。加えて機能性資材トレハロースを粳米飼料へ添加し、慢性暑熱感作時における粳米給与による成長低下の改善効果を実験的に示した（第四章第二節）。

今後、本研究で明らかにした「暑熱ストレス時における飼料用米の積極的活用基礎技術」を実用可能な飼養技術として確立するためには、さらなる実規模試験を重ねる必要がある。また、暑熱以外のストレス環境、例えば寒冷や飼育密度などの条件下における飼料用米給与の影響の調査や、様々なストレス下における実証試験を実施し、より汎用性の高い飼養技術の確立が可能となる。さらに、粳米飼料の生産現場への普及に向けて、情報公開及び広報活動にも力を入れ、飼料用米が家禽産業に受け入れられる土壌を作っていくことは重要であると考ええる。こうした一連の課題に真摯に取り組み、飼料用米の家禽産業への積極的利用を加速させることで、将来における国産飼料自給実現に一步近づくと確信している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	南都 文香
審 査 委 員	主査：教授 豊水 正昭 副査：教授 麻生 久 教授 種村 健太郎
学 位 論 文 題	飼料用米給与時における鶏の暑熱感作応答
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>我が国の畜産において飼料穀物の海外依存は深刻な問題である。特に、家畜飼料の主体であるトウモロコシは、飼料用としてのみならず、バイオエタノール原料としての需要拡大や干ばつによる不作などにより、国際的需給がひっ迫している。このため、輸入トウモロコシに替わる国産自給飼料穀物として、米の畜産への活用が期待されている。飼料としての実用化を想定すると、米は全粒粳米（粉碎や粳摺りなどの加工を施していない形状）での利用が望ましいが、全粒粳米の飼料化に関連する試験報告はほとんどない。</p> <p>本研究では、飼料用粳米の利用促進を目的に、他の産業動物以上に全粒粳米の積極的利用が期待できる家禽における、特にストレス環境下での至適飼料配合条件について検討した。夏季の暑熱環境は代表的ストレス要因の一つで、地球温暖化への対策の観点からも重要な課題である。本研究では、暑熱環境下でも全粒粳米の潜在力を最大に発揮できる飼養技術を確立するため、暑熱環境感作時における全粒粳米の給与が肉用鶏の生産性ならびにストレス応答におよぼす影響を明らかにし、さらに、その応答機序の一端を解明するとともに栄養制御を試みた。</p>	

第一に、鶏における粳米飼料の栄養特性について、通常温度環境（熱的中性圏）、急性暑熱および慢性暑熱環境下で調べた。その結果、粳米飼料は、従来のトウモロコシ主体飼料と比べ、通常温度環境では同等の成長を示し、急性暑熱感作時では骨格筋の脂質過酸化を抑制し、腸管の形態的損傷（絨毛：陰窩比の低下）を緩和していることが判明した。一方、慢性暑熱感作時では、粳米飼料は、トウモロコシ飼料と比べ、同等の成長を示したが、腸管の形態的損傷ならびに全身の炎症反応を亢進し、粳米飼料負の効果があることが明らかになった。

第二に、慢性暑熱感作時の粳米飼料によるストレス亢進には粳米と共存する飼料中の高い含量の油脂が関係していることが明らかとなり、慢性暑熱環境下では標準的なエネルギー含量に調製した粳米配合飼料の実用化は難しいと判断された。

第三に、この慢性暑熱感作時における粳米飼料による成長低下の発現機序は、まず腸管における形態的および酸化的損傷の増加により、バリア機能が低下し、腸内細菌由来の内毒素が流入し、腸管で炎症反応が誘導され、流入した内毒素ならびに炎症反応により産生されたサイトカインが肝臓に作用し、肝臓でストレス反応が亢進し、その結果成長が低下したと推察された。また暑熱感作にともなう腸内細菌叢変化が腸管の炎症反応亢進に関与した可能性も考えられた。さらに機能性資材トレハロースを粳米飼料に添加すると、慢性暑熱感作時における粳米による成長低下が緩和されることを明らかにした。

これまで飼料米に関する多くの研究は、精白米や玄米の給与試験に限られていたが、本研究では、慢性暑熱感作時における粳米飼料の負の効果と、これに関連する要因を明らかにし、その際の成長低下機序の一端を解明した。さらに、機能性資材添加による栄養制御法を例示した。本研究は、今後、飼料用米の家禽産業への積極的利用を加速させていく上で重要な情報を提供すると考えられる。

審査委員一同は、本論文提出者に対し、博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。